

# 第13回近畿HLA研究会

## 抄録

会 期：1996年2月17日(土)

会 場：三和化学研究所大阪メディカルホール 4F会議場

〒 532 大阪市淀川区宮原4-3-5

T E L 06-394-3831

世話人：和歌山県立医科大学 泌尿器科学 平野 敦之

〒 640 和歌山市七番丁27番地

T E L 0734-31-2151 内線 295

F A X 0734-31-0522

### I. 一般演題

## 1. INNO-LiPA 法を用いた HLA class II DNA typing

佐田 正晴<sup>1)</sup>, 羽鳥 基明<sup>1)</sup>, 王 晶釘<sup>1)</sup>, 大橋 寿美<sup>1)</sup>, 辻 隆之<sup>1)</sup>,  
Marie-Marthe Tongio<sup>2)</sup>, Marcel Tilanus<sup>3)</sup>, Patty Hendrix<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>国立循環器病センター研究所, <sup>2)</sup>CRTS, Strasbourg <sup>3)</sup>Utrecht Univ. Molecular Pathology <sup>4)</sup>INNOGENETICS

INNOGENETICS社により開発されたINNO-LiPAキットによりclass II alleleの決定を行い本法の検討を行った。本法の原理は、ビオチン化されたPCR産物をoligonucleotide probeが平行に固定されたmembrane上で特異的にhybridizeさせるreverse hybridizationに基づいている。hybridization後streptavidinをラベルしたalkaline phosphataseが結合しBCIP/NBTを基質とした呈色反応により各alleleの決定が行われる。既にPCR-SSP法によりalleleが決定している細胞を用い本法により決定されたalleleとの一致率およびprobeの検討を行った。DRB1+3+4+5の

検討には582細胞を用い他法との一致alleleは97%、DR4-specificでは75細胞、150allele中147alleleが一致(98%)、DPB1では246細胞、492allele中482allele(98%)またDQB1では100%の高い一致率を認めた。本キットには全ての試薬が含まれ、3.5時間でassayが完了し、特別な機器も不要で非常に完成度の高いキットと思われる。また専用解析programにより瞬時にしてalleleの決定が可能である。欧米では既に骨髄移植、臓器移植に導入され高い評価を得ており、12th IHSWS technology componentの一部門として現在検討が行われている。

## 2. PCR-SSOP 法による HLA-C アレルタイピング

兼重 俊彦<sup>1)</sup>, 中谷 さやか<sup>1)</sup>, 平井 博美<sup>1)</sup>, 伊藤 要一<sup>1)</sup>,  
福森 泰雄<sup>2)</sup>, 大軒 子郎<sup>2)</sup>, 柴田 博俊<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>シオノギ製薬, 診断医学部 <sup>2)</sup>大阪府赤十字血液センター, 研究部

PCR-SSOP 法を用いた C ローカスのアレルタイピングについて検討した。第 2 エクソン内の可変部位 (nt268~283) の配列を用いた C ローカス特異的なセンス及びアンチセンスプライマーと, 第 2 エクソンの 5'側および第 3 エクソンの 3'側の領域のそれぞれでアレルグループ特異的な多型性部位に対応する 4 種類のプライマー (計 8 種類) を設定し, ゲノミック PCR を行った。日本人 43 例を対象として, 第 2 エクソンのグループ毎の PCR 産物をプロットし,

合計 16 種類の SSO プローブ (13 mer) とのハイブリダイゼーションから得られたシグナルのパターンにより, 血清学的な C ローカスタイプと整合する C ローカスアレルが検出可能であった。またこの他に Cw\*12, \*14, \*15 が検出された。さらにもう一方の第 2~3 エクソンの PCR 産物に対し合計 23 種類の SSO プローブを用いた解析を加えることで high resolution タイピングが可能になると思われる。

## 3. HLA-A, DP ミスマッチによる 輸血後 GVHD 症例

能勢 義介<sup>1)</sup>, 南雲 文夫<sup>2)</sup>, 稲葉 洋行<sup>1)</sup>, 荒木 延夫<sup>1)</sup>, 藤原 宝子<sup>1)</sup>, 浜中 泰光<sup>1)</sup>,  
阪田 宣彦<sup>1)</sup>, 成瀬 妙子<sup>3)</sup>, 猪子 英俊<sup>3)</sup>, 鍋谷 登<sup>4)</sup>, 一色 玄<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup>兵庫県赤十字血液センター <sup>2)</sup>佐賀医大, 輸血部 <sup>3)</sup>東海大学医学部, 分子生命科学  
<sup>4)</sup>ナベヤクニック <sup>5)</sup>大阪市立大学医学部, 小児科

今回 HLA-A, DP 不適合による輸血後 GVHD 症例を経験した。患者は採血 4 日後の 400 ml 濃厚赤血球が輸血された。患者は HLA-A24, A33, B7, B54, Cw1, Cw7, DRB1\*0101, 0405, DQA1\*0101, 0301, DQB1\*0401, 0501, DPB1\*0201, 0501 をドナーは HLA-A24, A-, B7, B54, Cw1, Cw7, DRB1\*0101, 0405, DQA1\*0101, 0301, DQB1\*0401, 0501, DPB1\*0501, 1901 を示し,

GVH 方向に A33 と DPB1\*0201, 拒絶方向に DPB1\*1901 の不適合を認めた。両者間の MLC 反応は GVH 方向に SI が 4.2 の弱い T 細胞活性を認めた。このことより, HLA-クラス I とクラス II 抗原の両者の不適合抗原が重なったことにより, 強度の GVH 反応を引き起こす活性化 T 細胞が誘導され, 患者を死に至らせたものと考えられる。

## 4. 非血縁者間骨髄移植における DNA クロスマッチ

丸屋 悦子<sup>1)</sup>, 佐治 博夫<sup>1)</sup>, 横山 繁樹<sup>1)</sup>, 赤座 達也<sup>1)</sup>, 十字 猛夫<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>京都府赤十字血液センター, 研究部 <sup>2)</sup>日本赤十字中央血液センター

## 5. 新しい DQB1\**MAT* (DQB1\*0306)

斉藤 敏<sup>1)</sup>, 太田 智<sup>1)</sup>, 橋爪 清隆<sup>1)</sup>, 山田 英世<sup>1)</sup>, 兼重 俊彦<sup>2)</sup>,  
木下 朋子<sup>3)</sup>, 橋本 光男<sup>3)</sup>, 小口 弘子<sup>4)</sup>, 石井 栄三郎<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>長野県赤十字血液センター, 検査課 <sup>2)</sup>シオノギ製薬, 診断医学部  
<sup>3)</sup>兵庫県立西宮病院, 腎移植センター <sup>4)</sup>長野県立こども病院

骨髄移植のため, 患者家族の DNA タイピングを行ったところ, PCR-RFLP 法にて HLA-DQB1 の新アリルが見つかった. 新アリルは祖母より父親, そして二人の子どもへと遺伝していた. 血清学の反応は, 父親および二人の子どもは DQ3 陽性, 祖母は DQ6 陽性となり, 血清学では検出できなかった.

新アリルの塩基配列は, 5' からコドン 57 番目までが DQB1\*03032, 0302 と同じで, 58 番目から 3' までが DQB1\*04 と同じであった. この DQB1 の新アリルは, 1995 年 11 月に WHO の命名委員会により DQB1\*0306 と公認された.

## 6. 新しい血小板型抗原 Ouc

荒木 延夫<sup>1)</sup>, 稲葉 洋行<sup>1)</sup>, 藤原 宝子<sup>1)</sup>, 浜中 泰光<sup>1)</sup>, 能勢 義介<sup>1)</sup>,  
阪田 宣彦<sup>1)</sup>, 松下 勲子<sup>1)</sup>, 石川 隆之<sup>2)</sup>, 柴田 洋一<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>兵庫県赤十字血液センター <sup>2)</sup>神戸市立中央市民病院, 免疫血液内科 <sup>3)</sup>東京大学医学部付属病院, 輸血部

## 7. HLA-DP 遺伝子領域の超可変部と T 細胞活性

能勢 義介<sup>1)</sup>, 稲葉 洋行<sup>1)</sup>, 藤原 宝子<sup>1)</sup>, 浜中 泰光<sup>1)</sup>, 阪田 宣彦<sup>1)</sup>,  
成瀬 妙子<sup>2)</sup>, 猪子 英俊<sup>2)</sup>, 鍋谷 登<sup>3)</sup>, 一色 玄<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>兵庫県赤十字血液センター <sup>2)</sup>東海大学医学部, 分子生命科学  
<sup>3)</sup>ナベヤクニック <sup>4)</sup>大阪市立大学医学部, 小児科

現在 DPB1 遺伝子領域は, 第 1~6 超可変部より構成され, 第 4~6 超可変部の共通アミノ酸により DP アロ抗原が認識される。さらに DP 抗原による一次 MLC 活性が認められ, これらの反応は第 4~6 超可変部のアミノ酸が異なることにより反映されている可能性が高い。そこで今回第 4~6 超可変部のアミノ酸の組み合わせによる MLC 活性の強弱を検討した。まず第 4 超可変部は 6 種, 第 5 超可変部は 4 種, 第 6 超可変部は 4 種の共通アミノ酸に分類

された。そして第 6 超可変部のみが異なる刺激細胞 DPB1\*0402 と反応細胞 DPB1\*0501 の MLC 反応は,  $6818 \pm 1438$  cpm, DNV 値  $37.1 \pm 11.1$  を, 第 4 超可変部のみが異なる刺激細胞 DPB1\*0402 と反応細胞 DPB1\*0201 の MLC 反応は,  $3871 \pm 881$  cpm, DNV 値  $21.1 \pm 3.1$  を示し第 6 超可変部が第 4 超可変部より高い T 細胞活性を認め,  $\alpha$  フェリックス左端部方向のアミノ酸の位置数が高い程, 強度の MLC 活性を有する可能性を示唆した。

## 8. 移住・拡散ルートが異なると推定される B62 に連鎖している 2 つの DR4 ハプロタイプ

木下 朋子<sup>1)</sup>, 橋本 光男<sup>1)</sup>, 兼重 俊彦<sup>2)</sup>, 山崎 美保<sup>1)</sup>, 福西 孝信<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>兵庫県立西宮病院, 腎移植センター <sup>2)</sup>シオノギ製薬, 診断医学部

2219 人の日本人集団を対象とし, B62 に連鎖する DR4 ハプロタイプについて解析したところ, 2 種類の特徴的なハプロタイプがみとめられた。a) A24-Cw9-B62-DRB1\*0403-DQA1\*0301-DQB1\*0302, b) A\*1101-Cw4-B62-DRB1\*0406-DQA1\*0301-DQB1\*0302 の 2 種類である。第 11 回国際組織適合性ワークショップのまとめより, B62-Cw9 は白人,

イヌイット等の北方に居住する集団でみとめられるのに対し, B62-Cw4 はパプア・ニューギニア等の南方の集団にみられることより, 日本人集団でみとめられる 2 つの B62-DR4 ハプロタイプは, 北方, 南方という別の地域からの移住, 拡散がすすめられたことを示唆するものと考えられた。

## 9. 血清学的に A ローカス UK を認めた 1 家系

内藤 早織<sup>1)</sup>, 三根 英子<sup>1)</sup>, 新野 一恵<sup>1)</sup>, 坪山 邦子<sup>1)</sup>, 山中 烈次<sup>1)</sup>, 矢原 靖司<sup>1)</sup>,  
横山 繁樹<sup>1)</sup>, 佐治 博夫<sup>1)</sup>, 光永 滋樹<sup>2)</sup>, 日比 成美<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>京都府赤十字血液センター <sup>2)</sup>日赤中央血液センター <sup>3)</sup>京都府立医科大学, 小児科

**目的:** 骨髄移植を目的として患者家族 (患者とその両親) の HLA 型検査を実施したところ, HLA-A 座において, 遺伝的に矛盾を認めた. そこで, 発端者 (患者の父親) の HLA-A 座について検討を加えたので報告する.

**材料と方法:** 発端者は37才男性の健常者である. class I タイピングは4種類のタイピングトレイト, 156種類の HLA-A 座特異抗体を使用し LCT 法で実施した.

class II タイピングは, LCT 法, PCR-MPH (polymerase chain reaction - microtiter plate hybridization) 法, PCR-RFLP (PCR - restriction fragment length polymorphism) 法, PCR-SSP (PCR-sequence specific primer) 法で実施した. さらに, HLA-A 座の対立遺伝子を確認するため PCR-SSP 法, および PCR-RFL 法を実施した.

**結果:** HLA 型検査の結果は, 発端者は A24/-, B51/61, Cw3/-, DR15/4, DQ1/3, 妻は A2/-, B7/59, Cw1/7, DR1/4, DQ1/4, 発端者の児は A2/-, B59/61, Cw1/3, DR15/4, DQ1/4であった. また, 発端者のリンパ球は A 座特異抗体のうち抗 A24を含む血清にのみ反応した. このことか

ら, 発端者は a: A blank-Cw3-B61-DR15-DQ1, b: A24-Cw blank - B51-DR4-DQ3, 妻は c: A2-Cw1-B59-DR4-DQ4, d: A2-Cw7-B7-DR1-DQ1 のハプロタイプを有しており, a と c のハプロタイプが児に遺伝していると考えられた. HLA-A 座の PCR-SSP 法を実施した結果, 発端者は A2 および A24 に特異的なプライマーによる増幅産物が検出された. さらに, PCR-RFLP 法を実施したときも同様に, A\*02/A\*24ヘテロと判定される切断片が認められた. また, 妻と児にそれぞれの DNA で, PCR-SSP 法および PCR-RFLP 法を実施した結果, 二人とも A\*02だけが確認できた.

**考察:** 血清学的には, 発端者のリンパ球は抗 A24を含む抗血清にのみ反応し, それ以外の A 座特異抗体とは反応しなかったが, DNA 検査を実施した時, A\*24以外に A\*02と考えられる対立遺伝子が確認できた. これらの結果から, この対立遺伝子は使用した抗血清とは反応しない新しい A 座抗原, または, プロモータ領域に異常があるため mRNA に転写されない, あるいは DNA に変異が起こっている等が推定できる. これらについては現在, 検討中である.

## 10. IgA 腎症における補体 C4多型と腎機能予後の関連の検討

勝二 達也<sup>1)</sup>, 中村 弘之<sup>1)</sup>, 林 晃正<sup>1)</sup>, 岡田 倫之<sup>1)</sup>,  
中西 功<sup>1)</sup>, 椿原 美治<sup>1)</sup>, 西向 弘明<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>大阪府立病院, 腎臓内科 <sup>2)</sup>愛媛大学医学部, 法医学

本邦 IgA 腎症患者を対象に, 腎機能予後と C4多型の関連を検討し, 予後予測因子としての有用性を検討した. 腎生検にて診断した本邦 IgA 腎症患者 74名 (M: 29, F: 45) を対象とした. C4多型はアガロースゲル電気泳動法で検討, 抗ヒト C4抗血清を用い免疫固定法で観察した. 腎生検時を観察開始とし, 平均 $48.8 \pm 26.8$ 月腎機能予後を追跡した.

A3 allele は観察終了時の尿蛋白と血清 CR, B1 allele は観察終了時の血清 CR と相関し, 予後不良因子と考えられた. 一方, B2 allele は観察終了時の尿蛋白, 血清 CR と相関し, 予後良好因子と考えられた. 欧米人の検討では, AQ0, BQ0と予後の間に有意な相関が指摘されているが, 日本人を対象とした検討では, そのような傾向は見られなかった.

## 11. HLA-DR と Sarcoidosis の臨床, 1995年末の現況

立花 暉夫<sup>1)</sup>, 安波 礼子<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>大阪府立病院, 内科 <sup>2)</sup>同 臨床検査科

1) 1991年国際サ会議で立花は日本サ症例の成績を括めて, HLA-DR52が高頻度であると報告したが, 1995年国際サ会議でSweden サ症例ではHLA-DR3が殊に経過良好例では経過不良例に比して, 高頻度と報告があり, 1994年には同様の成績がイタリア, チェコの本症例について確認されている. 2) 大阪地区サ症例のPCR-SSOP法によるHLA-

DRB1-DNA Typing 成績では, HLA-DRB1\*1201, 0803が高頻度で, 東京, 浜松地区サ症例でも1201, 0802, 0803が高頻度と報告されている. 大阪地区サ症例について, 経過不良例 (5年以上サ病変持続例) は経過良好例 (2年以内サ病変消失例) に比して, 1201 (-), 0803 (+) が高頻度であった.

## II. 特別講演

### 「クラス I 抗原の DNA タイピング」

木村 彰方

東京医科歯科大学難治疾患研究所, 成人疾患研究部門, 異常代謝分野

HLA クラス II 抗原の DNA タイピング法は既に確立され, 臨床的な応用も可能となっている。我々はクラス I 抗原の DNA タイピング法の開発を行っているが, これまでに HLA-A 遺伝子の DNA タイピング法を確立したので, その現況を紹介する。

我々の HLA-A 遺伝子 DNA タイピング法では, 第 2 および第 3 エクソンを PCR 法で一括増幅し, 既知の全ての多型に対応する 91 種の SSOP とのハイブリダイゼーションを行うことで 60 種の対立遺伝子を区別する。ついで, この方法では区別できない A2 対立遺伝子 (A\*0201 と A\*0209 および A\*0207 と A\*0215N) について, 第 4 エクソンを対象とした A2 グループ特異的 PCR と 5 種の SSOP とのハイブリダイゼーションを行うことで, 最終的に全ての対立遺伝子型を区別する方法である。この方法を用いることによって, 日本人集団中に見出した 4 種の新たな対立遺伝子を含めて, 日本人では特に A2 および A26 に多様性が存在することを証明した。

この DNA タイピング法の臨床研究への応用として, HLA-A2 と自己免疫性甲状腺疾患との相関解析および HLA-A, B, DR 一致非血縁者間骨髄移植ペアにおける HLA 型一致と臨床予後との関連を解析した。その結果, Graves 病と A\*0206 および橋本病 A\*0207 の強い相関を見出した。すなわち, Graves 病と橋本病では相関を示す A2 サブタイプが異なることから, 疾患発症に関わる自己抗原が異なることが示唆された。一方, 非血縁者間骨髄移植ペアでは, その約 25% に HLA-A 遺伝子型不一致 (サブタイプ不一致) が認められ, A 不一致例では GVH 病発生率が高く, かつ生存予後も不良であることが示された。HLA-A 不一致による臨床予後への影響は HLA クラス II 遺伝子型一致ペアに限っていても観察されるため, HLA クラス I 抗原についても遺伝子レベルで一致したドナーの選択が望ましいと考えられた。

### III. シンポジウム

(司会 伊藤 喜一郎, 大阪府立病院 泌尿器科)

## 「臓器移植と HLA-DNA タイピング」

### 1. 骨髄移植におけるアレルタイピングと クロスマッチ

佐治 博夫

京都府赤十字血液センター, 研究部

同胞間骨髄移植では家族の HLA から, そのアレル適合性が容易に確定できるので, 精密なアレルタイピングは不要である。同胞間以外の血縁間移植では, ときとして haplotype の共有が証明できないことがあり, その場合においてのみアレルタイピングが必要になる。非血縁間骨髄移植では, 血清学的抗原の一致をドナー検索に用いるが, GVH や HVG に関わる T 細胞は, 抗体分子の識別能力をはるかに超える精密な能力を有しているため, それに見合うアレルマッチングが必要になる。日本骨髄バンクではすでにクラス II について 3 次検査で DRB1 の適合性を検査して移植医に報告している。アメリカの NMDP では数 100 例の移植ペアのアレル適合性と移植成績の相関を検討し, DRB1 適合性が他の座位より強い影響を与えることを報告している。

一方, 日本人の非血縁間骨髄移植においては, HLA-A, -B アレル適合性が, その成否に強く影響することがわかった (笹月班)。とくに HLA-A2 は日本人ではアレル多型性が存在し (A\*0201, 0206, 0207, 0210), haplotype からそのアレルを推定できるのは一部に過ぎないことがわかった (A-0207-B46 など)。同時に抗原でアレル多型性が見られる主な抗原は A26, B61 などであり, それらも連鎖する他座位は多様である。

すなわち, haplotype 一致はかならずしもクラス I のアレル適合性を推定させるものではないことがわかった。クラス I アレル適合をマッチングの条件として導入する必要がある。分類数の増加と検査の複雑性に比類してタイピングの過誤は増加する。これを検出し, 適合性を確認する直接クロスマッチングの必要性はますます高まっている。

## 2. 腎移植における DNA タイピングの意義と現況

佐田 正晴

国立循環器病センター研究所

死体腎移植においては HLA-A, -B, -DR6 antigen matched pair を除き血清学的に同定された donor の DR 抗原を基に移植が行われてきた。しかし donor の血清学的 DR 抗原の同定は、細胞表面抗原の修飾、反応性の低下や B 細胞の低回収率等の理由から困難を極めた。PCR 法を応用した class II genotyping が移植分野にもたらした最大の恩恵は、従来の手法で決定が困難或いは不安定であった donor の class II 抗原 subtype や blank 抗原が正確に同定され、最適な recipient を選択し移植が可能になったことであろう。最近 class II 分子の三次元立体構造が明らかにされると共に HLA

分子—ペプチド複合体を TCR に提示する同種抗原認識機構が解明されつつある。死体腎移植症例の DR アミノ酸適合度の解析から、DR 抗原が不適合であっても DR 分子上のアミノ酸残基グルーピングから適合症例と認められる組み合わせの存在も示唆されている (permissible DR antigen)。DR 分子上のアミノ酸適合性の解析は、今後の拒絶反応回避のため TCR が認識する T 細胞エピート部分のアミノ酸置換、可溶性ペプチド—DR 分子結合体の投与による TCR プロッキング等、特異的免疫抑制の導入を現実的にする上でも重要と考えられる。

## 3. 新ネットワーク(近畿ブロック)の HLA 検査の現況—大阪, 奈良地区における HLA タイピングの現状および HLA と腎移植成績—

久山 芳文

大阪府立病院, 組織適合検査室

1) 腎移植希望者754例, 腎提供者54例の血清学的方法と DNA タイピングの結果を解析した。IWS 分類 (1-18) および JWS 分類 (IWS に加えて4.1, 4.2, 8.1, 8.2, NJ25) と DRB1 の不一致率は、希望者では前者で2.5%, 後者3.7%, 提供者では前者2.7%, 後者4.6%であった。2) 1992年1月より実施された大阪, 奈良地区の91腎移植症例について

HLA 適合効果を調べた。91例の4年生着率は90%であった HLA-A, B, DRB1各々, およびこれらの組み合わせにおけるミスマッチ数とその生着率には有意の差は認められなかった。当地区では、従来 HLA 適合度を基に医学的所見を加味して複数の候補者の中から受者が選択されたきた。この選択方法が今回の結果につながったと考える。

## 4. 新腎臓移植ネットワークにおける HLA 検査の位置づけ—現況と将来の展望—

福西 孝信

兵庫県立西宮病院, 腎移植センター

新しく発足した腎臓移植ネットワークはこれまでの地方腎移植センター時代の希望者登録をそのまま引き継いだ。引き継いだ希望者の HLA タイプは移植施設の事情により質的に大きな差があることがわかった。本ネットワークは公平, 適正な腎の分配を行うため, HLA の適合度を最優先項目としているため, この質的差は大問題となった。

HLA 抗原の分類を1991年の WHO 命名委員会の決めたものを使うということに対するこだわりがこの大問題の解決するにあたり新たな問題を生じさせた。現在の HLA タイピングは1996年の技術と抗原分類法で行っている。しかし登録患者のデータは1991年である。この問題を解決するためには, DNA タイピングを導入するしかない。